

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN(11)Publication number : **59-204122**(43)Date of publication of application : **19.11.1984**

(51)Int.Cl.

A61K 35/12
A61K 35/23(21)Application number : **58-078300**(71)Applicant : **KOKEN KK**
IJIMA KUNIHITO
TAJIMA TOMOYUKI
NAGANUSHI YOUICHIROU(22)Date of filing : **06.05.1983**(72)Inventor : **TAJIMA TOMOYUKI****(54) PREPARATION OF AGENT FOR INHIBITING PROLIFERATION OF MALIGNANT TUMOR CELL OF ANIMAL****(57)Abstract:**

PURPOSE: To prepare the titled proliferation inhibiting agent having little side effect, by culturing malignant tumor cells of an animal, removing the cultured cells from the medium, subjecting the medium to the ultrafiltration with an ultrafiltration membrane having a specific critical molecular weight, and collecting the fraction having a molecular weight higher than a specific level.

CONSTITUTION: Malignant tumor cells of an animal (including human) are cultured, and the proliferated cells are removed from the medium. The obtained medium is subjected to the ultrafiltration with an ultrafiltration membrane having a critical molecular weight of 500 (e.g. VM05 produced by Amicon Ltd.), and the fraction having a molecular weight of ≥ 500 is collected to obtain the objective agent to inhibit the proliferation of the malignant tumor cells of an animal. The fraction having a molecular weight of ≥ 500 and obtained by the above process is found to have remarkably high effect to inhibit the proliferation of the cells compared with the fraction having a molecular weight of < 500 . It exhibits high proliferation-inhibiting effect even under diluted state, and the preparation obtained by the above process is almost free of side effects in contrast with conventional antitumor agents.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

⑫ 特 許 公 報 (B 2)

平4-72807

⑤ Int. Cl.³A 61 K 35/12
// A 61 K 35/23

識別記号

ADU

庁内整理番号

9165-4C
9165-4C

⑭ 公告 平成4年(1992)11月19日

発明の数 1 (全2頁)

⑬ 発明の名称 人の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤の製造方法

⑮ 特 願 昭58-78300

⑯ 公 開 昭59-204122

⑰ 出 願 昭58(1983)5月6日

⑱ 昭59(1984)11月19日

⑲ 発 明 者 田 島 知 行 千葉県市川市八幡6-5-15

⑳ 出 願 人 興 研 株 式 会 社 東京都千代田区四番町7番地

\textcircled{21} 出 願 人 飯 島 邦 仁 神奈川県川崎市多摩区東生田1-15-16 タマキナ荘3号

\textcircled{22} 出 願 人 田 島 知 行 千葉県市川市八幡6-5-15

\textcircled{23} 出 願 人 長 主 陽 一 朗 神奈川県大和市中央3丁目9番4号

\textcircled{24} 代 理 人 弁 理 士 竹 本 松 司 外1名

審 査 官 横 尾 俊 一

\textcircled{25} 参 考 文 献 特 公 平 3 - 60804 (JP, B 2)

1

\textcircled{26} 特許請求の範囲

1 ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞を培地ベイサル
メディアム イーグル (Basal Medium Eagle)
培養し、別の無血清培地に移し30℃～37℃で一週
間培養し、次いで培養から悪性腫瘍細胞を除去し、
該培地を分子量500で分画する限外濾過膜で
限外濾過し、分子量500以上の分画の物質を採取
することを特徴とする人の悪性腫瘍細胞増殖抑制
剤の製造方法。

発明の詳細な説明

この発明は、人の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤の製
造方法に関する。

特願昭57-143340号のヒト腎細胞癌由来樹立株
細胞、ヒト腎癌由来樹立株細胞、ヒト肺癌由来樹
立株細胞、ヒト口腔底癌由来樹立株細胞およびヒ
ト筋原性肉胚樹立株細胞から選ばれた人の悪性腫
瘍細胞を血清無添加の培地中で3～4日間培養
し、その培地より前記腫瘍細胞並びに分子量1000
以上のものを除外してなる人の悪性腫瘍細胞増殖
抑制剤の発明は、正常細胞に対しても多少の増殖
抑制が認められるが、悪性腫瘍細胞に対して著し
い増殖抑制力がある。

前記発明は、分子量500～1000のものを含んで
いるが、培地を例えばアミコン社製UM05、また

2

はYA05などの分子量500で分画する限定濾過膜
で限定濾過を行い、分子量500以上の分画と500未
満の分画とに分け、その各々の分画について培養
癌細胞の増殖抑制効果を調べると、分子量500以
上の分画により採取した物質は、500未満の濾過
液と比べ、より著しい増殖抑制力があり、希釈し
てもなお高率の増殖抑制力を示し、分子量500未
満のものより、有効成分が濃縮されていることが
解かった。

10 また、この製造方法により得られた悪性腫瘍細胞増殖抑制剤は、従来の抗腫瘍剤のような副作用がほとんどないと考えられる。

本発明の人の悪性腫瘍細胞の増殖抑制剤の製造
方法は、前記の点を鑑み、ヒト腎細胞癌由来樹立
株細胞を培地ベイサル メディアム イーグル
(Basal Medium Eagle) で培養し、別の無血清
培地に移し、30℃～37℃で一週間培養し、次いで
培地から悪性腫瘍細胞を除去し、該培地を分子量
500で分画する限外濾過膜で限外濾過し、分子量
500以上の分画の物質を採取することを特徴とする
ものである。

次のこの発明の実施例について述べる。

- (1) 実験材料とした細胞
- (2) 培養

成長用培地には10%牛新生児血清を添加した
ベイスル メディウム イーグル (Basal
Medium Eagle) (BME) および5%牛新生児
血清を添加したRPMI1640を成長用培地
(growth medium) として用い、抽出用の培
地としては、血清無添加のBMEを使用した。

まず成長用培地を用い、培養器に飽和状態に
なるまでヒト腎細胞癌由来樹立株HRC細胞を
増殖し、その後1回洗って血清を除く。

次に、これを抽出用培地として150 cm^2 の底面
積を持つ培養器に50 ml の無血清のBMEと共に
 2×10^7 個以上の前記ヒト腎細胞由来株化細胞
HRCを加え、30 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ で一週間培養する。
次に前記のヒト腎細胞由来樹立株細胞を除去
し、その後、例えばアミコン社製のUM05、ま
たはYAO5等の分子量500で分画する限外濾過
膜で限外濾過を行い、分子量500以上の分画と
500未満の分画とに分け、各々の物質を採取す
る。

次に、この発明の効果を確認するための実験に
ついて述べる。

(1) 悪性腫瘍細胞増殖抑制剤の検定法

15 mm 径のプラスチックシャーレにヒト腎細胞由
来株化細胞HRC10 4 個を植え込み、通常のごと
く、10%牛血清添加BMEにて24週間培養する。
次に、前記実施例の方法で採取した分子量500以
上の分画の物質をfr.1とし、500未満の分画の物
質をfr.2とし、これら各群の培地に新たに最初の
BMEと同量のアミノ酸類、ビタミン類、グルコ
ースを添加し、先の24時間培養した培地と、これ

らの採取した物質を含む培地を培地交換し、6日
間5%CO $_2$ 、100%湿度の中、37 $^{\circ}\text{C}$ で培養を行い、
ヒト腎細胞由来株化細胞HRCの増殖を調べた。

(2) 実験結果

表は、悪性腫瘍細胞の増殖阻止率を表わしたも
ので、加えたヒト腎細胞由来株化細胞HRCから
各々の生存数を引いた増殖阻止数とし、分子量
500以上の分画より得た物質を含むものの増殖阻
止数とに対して500未満の分画より得た物質を含
むものの増殖阻止数と限定濾過膜にかけずに得た
もの(whole)の増殖阻止数を百分比(%)にし
て算出した。

この結果、分子量500以上の分画fr.1に著しい
増殖抑制効果が見られ、希釈しても高率の増殖抑
制効果が見られ、他の群より有効成分が濃縮され
ていることが解り、しかも二つのロットに共通の
結果が得られ、再現性が確認された。

(表)

ロット 番号	分画	増殖阻止率	
		希釈1倍	希釈2倍
830112	Whole	82%	28%
	fr. 1	100%	94%
	fr. 2	32%	6%
74-1	Whole	62%	11%
	fr. 1	100%	97%
	fr. 2	14%	0%